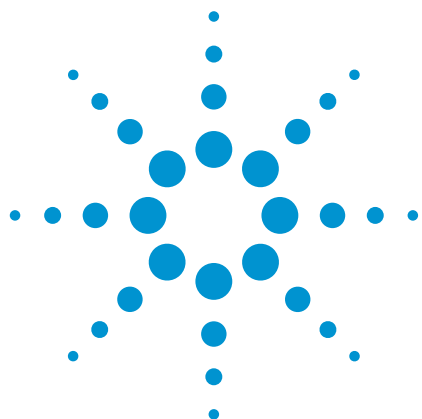




トリプル四重極 GC/MS による ハーバルインセンスブレンド中の 合成カンナビノイドの 確認および定量

アプリケーションノート

法医学

著者

Anthony Macherone, Ph.D.
Thomas J. Gluodenis, Jr., Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

合成カンナビノイドを含むハーバルインセンスブレンドの使用が危険なほど迅速に広まりつつあるため、今日の法医学ラボは、複雑なマトリックスに含まれる微量の規制成分を高い信頼性で確認し、定量するといった課題に直面しています。ここでは、30 を超える既知の合成カンナビノイドのうち、代表的な 17 種類のサンプルを分析し、トリプル四重極 GC/MS による分析メソッドの適用性を示します。このメソッドが持つ選択性によりマトリックス効果が軽減され、S/N 比が向上するため、分析結果の信頼性が大幅に高まります。また、このメソッドでは、質量スペクトルデコンボリューションなど、データ取り込み後の処理も不要になります。



Agilent Technologies

はじめに

合成カンナビノイドは、元来医学研究のために合成された大麻類似性化合物です。これらの化合物の使用が青少年の間で急速に広まっていること、また、コンビニエンスストア、ヘッドショップ、インターネットで広く入手可能なことが、米国を含む多くの国で重大な問題となっています。

合成カンナビノイドは、図 1 に示す 3 つの構造タイプに分類されます。最初のタイプ (1A) は、テトラヒドロカンナビノールと類似した構造の骨組みを持っています。2 番目のタイプ (1B) は、合成ナフトイルインドールの類似物です。3 番目のタイプ (1C) は、フェニルシクロヘキシルの一部です。ほとんどの合成カンナビノイドに共通の特長は、カンナビノイド CB1 および CB2 受容体と相互作用を起こすことが知られている短い脂肪族鎖があることです。

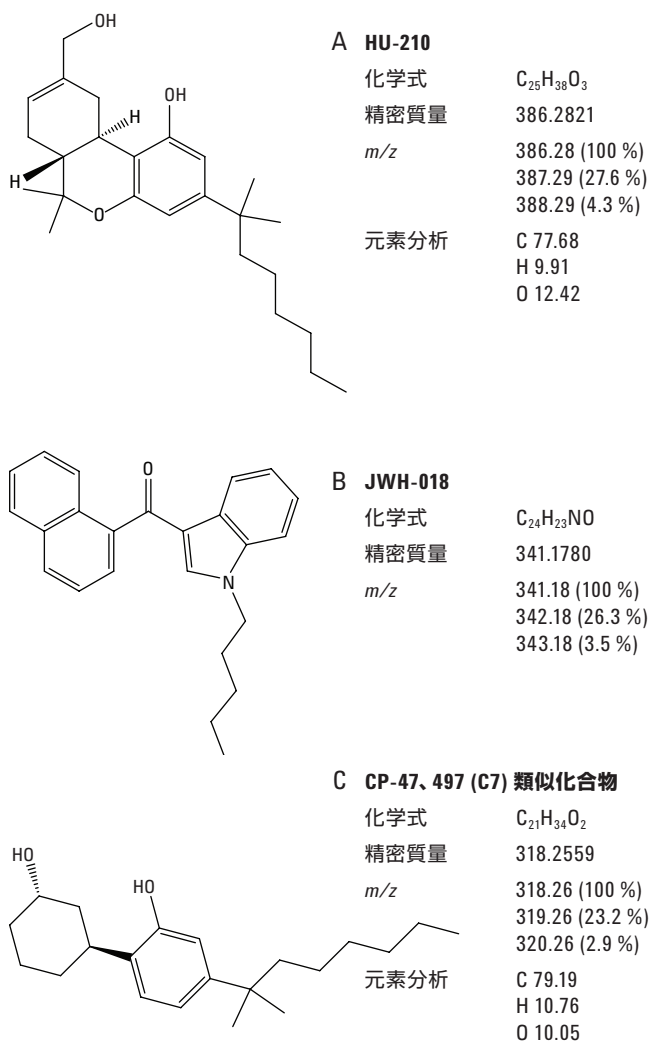


図 1. 合成カンナビノイドの 3 つの構造パターン

通常は、合成カンナビノイドは植物マトリックスで処方され (図 2)、ハーバルインセンスとして市販されます。これらは食用に不適切なものとして分類されているため、米国食品医薬品局 (FDA) による監視の対象にはなっていません。したがって、その製造、原料の品質、効能、総合的な安全性に関する規制はありません。これらの混合物は均質ではなく、効能に差があるため、意図せずに過量摂取の状態となり、けいれん、不安発作、心拍数上昇、血圧上昇、嘔吐、幻覚、妄想、見当識喪失などの重大な症状を短期間に併発することがあります。また、健康への長期的な影響は不明です。



図 2. 多くの場合、合成カンナビノイドは植物マトリックスで処方されます

米国を含む多くの国では、これらの化合物の中で特定の種類を禁止していますが、合成カンナビノイドの数は多く、現在も増え続けているため、規制が困難になっています。特定の種類の使用を禁止する法律が成立すると、即座に新しい種類の化合物が合成され、広まります。その使用が健康に及ぼす重大な危険性と社会に与える脅威により、米国麻薬取締局 (DEA) は、DEA と米国保健社会福祉省 (DHHS) が永続的な規制をするかどうか決定するまで、少なくとも 1 年間は 5 種類の特定の合成カンナビノイドを規制の対象とする緊急措置をとりました [1, 2]。現在、DEA は以下の物質を規制しています。

- JWH-018
- JWH-073
- JWH-200
- CP-47,497 (C7)
- CP-47,497 (C8)

HU-210 は、以前の DEA の決定により規制されています。規制対象外のものは 20 種類を超え、その数は増え続けています。

シングル四重極ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS) による合成カンナビノイド類似化合物および同族体の確認と定量は、分析上の課題を数多く抱えています。まず、植物マトリックスは驚くほど均質化が困難です。合成カンナビノイドにはさまざまな官能基が含まれるため、均質化に続く抽出には一般的なアプローチが必要です。ただし、一般的なアプローチでは大量のマトリックス物質が抽出され、非常に数多くのピークを持つ複雑なクロマトグラムが生成されます。

多くの場合、合成カンナビノイドを含むブレンドからは、その類似化合物や異性体が共溶出するため、これらがオーバーラップした質量スペクトルが得られます。また、合成カンナビノイドはきわめて効能が高く、マトリックス成分に比べて含有量が微量であることも分析をさらに困難にしています。これまでシングル四重極 GC/MS による分析は効果的で容易に複製できるアプローチとして説明されてきていますが [3、4]、このようなマトリックスの多い分析では、質量スペクトルデコンボリューションソフトウェアなどの特殊なソフトウェアを使用して解析が必要となるような複雑なデータが生成されます。

このアプリケーションでは、ハーバルブレンドの代表的なサンプルで合成カンナビノイドの存在を分析し、選択性と感度が高く、質量スペクトルデコンボリューションが不要な GC/MS/MS によるアプローチの適用性を示します。

実験方法

標準物質およびサンプル

30 を超える既知の合成カンナビノイドのうち 17 種類を GC/MS/MS メソッドの開発用に選択し、表 3 に示します。これらの化合物は、一般的なハーバルブレンドに見られる合成カンナビノイドの構造の多様性を網羅するように選択したものです。

分析したハーバルブレンドは EX 565、K2 Blondie、K4 Purple Haze、K3 XXX、Lunar Diamond、Zombie、K2 Diamond です。

サンプル前処理

均質化

ダミアナ (ツルネラディフサ) など、合成カンナビノイドのキャリアとして使用される植物原料は、柔らかく軽量です。このような特性を持つため、代表的なサンプリングのために碎いて均質化するのは困難です。そこで、約 500 mg のサンプルを、5 インチ x 5 インチの 100 グリッドサンドペーパー 2 枚の間に挟み、細粉になるまですり潰しました。

抽出

合成カンナビノイドには複数の官能基があるため、一般的な抽出アプローチが必要となります。この分析では、酸/塩基を組み合わせた抽出の後、遠心分離を行いました。また、メタノールインキュベーションを使用した抽出を実行することもできます。いずれのアプローチでも、大量のマトリックス成分が抽出されます。

酸/塩基アプローチを使用する場合には、まず 1 mL の脱イオン水を加え、10 % 塩酸を 3 滴加えて、均質化されたサンプルの一定量 (50~100 mg) を酸性にしました。次に、1 mL の溶媒 (95 % 塩化メチレン/5 % イソプロパノール v/v) を加え、サンプルと混合しました。サンプルを遠心分離し、下部の溶媒層を取っておきました。濃水酸化アンモニウムを 2 滴と 1 mL の溶媒 (95 % 塩化メチレン/5 % イソプロパノール v/v) を残りの水溶性混合物 (上の層) に加えました。サンプルを混合し、再度遠心分離を行いました。下の溶媒層をとり、最初に収集した溶媒層と合わせて、軽く混ぜ合わせました。このサンプルを GC/MS/MS 分析に使用しました。

誘導体化

HU-210 などの一部の合成カンナビノイドには、フェノールやアルコールなどの活性や極性を持つ官能基が複数含まれているため、GC/MS 分析には適していません。これらの化合物の感度を向上するために、BSTFA (N,O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド) と 1 % TMCS (トリメチルクロロシラン) による誘導体化を使用することで、官能基を覆い、同定と定量のためにより強度の高いイオンを生成することができます。しかし、このアプリケーションノートで説明する分析には誘導体化は必要ありません。

GC/MS/MS 分析

Agilent 7890A ガスクロマトグラフと Agilent 7000B 質量分析装置を組み合わせた Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS システムで GC/MS/MS 分析を行いました。

Agilent 7890A ガスクロマトグラフには HP-5MS UI カラムを装着しました。表 1 にガスクロマトグラフの分析条件を示します。

Agilent 7000B 質量分析装置は電子イオン化 (EI) MS/MS のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードで動作させました。表 2 に質量分析装置の動作条件を示します。

表 1. ガスクロマトグラフの分析条件

Agilent 7890A ガスクロマトグラフの分析条件

カラム 1	HP-5MS UI (Agilent、カリフォルニア州サンタクララ)
注入モード	パルスドスプリットレス
注入口温度	300 °C
注入量	1 µL
キャリアガス	ヘリウム、定流量モード、1.2 mL/min
オープンプログラム	80 °C (0.17 分間保持)、30 °C/min で 80 °C~300 °C (0.5 分間保持)、5 °C/min で 300 °C~340 °C (5 分間保持)
トランスファライン温度	325 °C

表 2. 質量分析装置の動作条件

Agilent 7000B 質量分析装置の動作条件

チューニング	オートチューン
ゲイン係数	50
取り込みパラメータ	電子イオン化、マルチプルリアクションモニタリング
コリジョンガス	窒素、1.5 mL/min、 ヘリウムクエンチガス、2.25 mL/min
溶媒待ち時間	7.0 分間
MS 温度	イオン源 300 °C、四重極 150 °C

MRM トランジションの開発は、最初に標準試料からフルスキャンスペクトルを収集し、次に分析に最適なプリカーサ/プロダクトイオンペアを特定するためにプロダクトイオンスキャンを行いました。次に、固有の各トランジションで最大のイオン強度が得られるように、コリジョンエネルギーを最適化しました。表 3 に、対象化合物のリストを、関連するプリカーサイオン、プロダクトイオンおよび最適化されたコリジョンエネルギーとともに示します。

表 3. 対象化合物と、関連するプリカーサイオン、プロダクトイオン、最適化されたコリジョンエネルギーおよびリテンションタイム

化合物名	プリカーサイオン	プロダクトイオン	コリジョンエネルギー	リテンションタイム (分)
AM-694	435	232	27	10.918
AM-694	435	220	13	
CP-47-497-C8	377	191	29	7.967
CP-47-497-C8	377	167	33	
HU-211	530	446	13	9.306
HU-211	446	299	21	
JWH-015	327	310	10	10.684
JWH-015	310	268	23	
JWH-018	341	167	23	11.375
JWH-018	324	254	23	
JWH-073	327	167	23	10.875
JWH-073	310	254	23	
JWH-081	371	197	23	13.238
JWH-081	354	269	31	
JWH-122	338	268	23	12.226
JWH-122	298	181	12	
JWH-133	312	269	12	7.348
JWH-133	269	93	23	
JWH-200	384	100	23	14.373
JWH-200	100	56	17	
JWH-203	339	214	3	9.954
JWH-203	214	144	17	
JWH-250	335	214	3	10.007
JWH-250	214	144	17	
JWH-251	214	144	17	9.553
JWH-251	144	116	12	
JWH-398	375	201	23	12.539
JWH-398	318	189	23	
RCS-4	321	264	19	10.259
RCS-4	264	135	17	
RCS-8	254	158	13	12.463
RCS-8	254	144	19	
WIN55 212-3/2	100	70	13	14.373
WIN55 212-3/2	100	56	15	

結果と考察

GC/MS/MS MRM 分析では、対象化合物がマトリックスから選択的に単離されます。図 3 に示すように、最初の四重極マスフィルタによって単離されたプリカーサイオンがコリジョンセルに入ります。コリジョンセルでは、このプリカーサイオンが、コリジョンガスと印加された電圧によりフラグメント化されます。このプロセスは衝突誘起解離 (CID) と呼ばれます。CID は、プリカーサイオンを固有の予測可能なプロダクトイオンに解離させます。第 2 の四重極マスフィルタを、ユーザーが指定した特定のプロダクトイオンだけが通過するように設定します。最も強度の高いイオン、つまりターゲットイオンを定量に使用します。クオリファイアイオンは、ターゲットイオンに対して正しい存在比で検出されているかを確認し、定性のために使用します。

干渉イオンが最初の四重極を間違えて通過し、コリジョンセルに入った場合でも、この干渉イオンから対象化合物のプリカーサイオンから生成するものと同じプロダクトイオンが生成される可能性はきわめて低いものです。このように、化学的ノイズはターゲットのシグナルから完全に分離されるため、S/N 比が大きくなり、従って感度も向上します。

シングル四重極質量分析装置を使用した選択イオン検出法 (SIM) を実行した場合と比較して、GC/MS/MS システムにより可能になった MRM 技術では、ハーバルインセンスブレンドなどの複雑なマトリックスに含まれる微量の合成カンナビノイドを検出する際の選択性と感度が大幅に向上します。

Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS : 動作

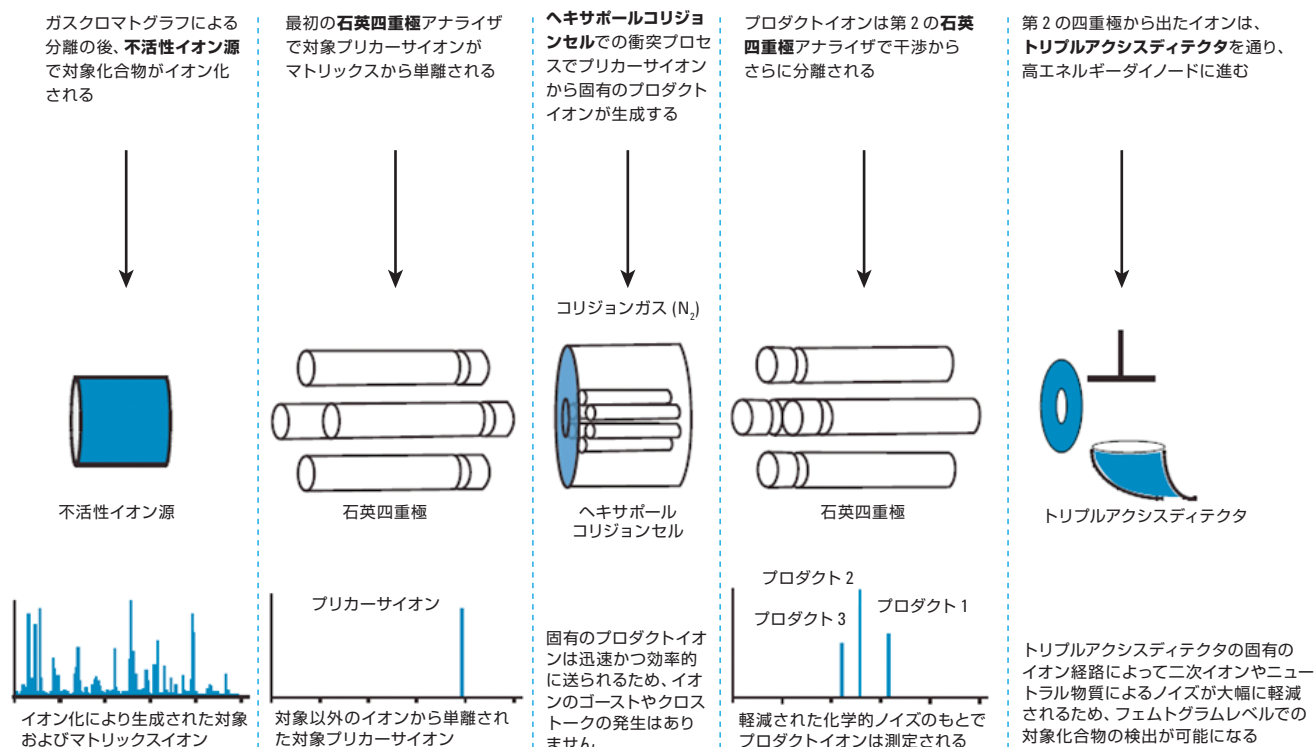


図 3. マルチプルリアクションモニタリング (MRM) 技術

100 ng/mL の標準混合物の MRM 全イオンクロマトグラム (TIC) を図 4 に示します。分析用に選択した 17 種類のすべての合成カンナビノイドが検出されました。GC/MS/MS 技術の高い選択性により、化学ノイズは無視できる程度になり、非常にクリーンな TIC が得られます。

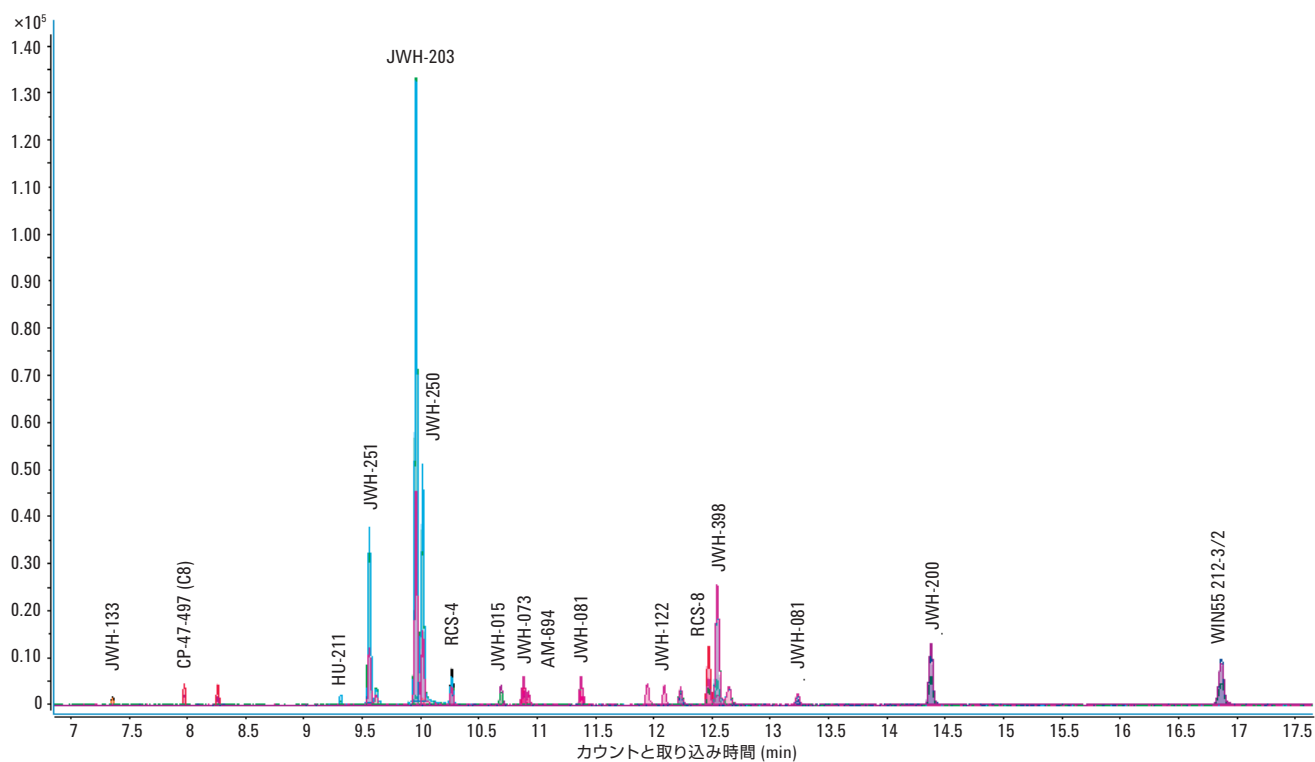


図 4. 100 ng/mL の標準混合物の MRM 全イオンクロマトグラム。17 種類のすべての合成カンナビノイド標準を容易に検出可能

検量線は既知量の標準をブランク抽出マトリックスにスパイクすることで、100~400 ppb の範囲で作成しました。100 ppb、200 ppb、および 400 ppb で注入を繰り返しました ($n = 3$)。すべての対象化合物における検量線の直線性の相関係数 (r^2) の平均は 0.99、標準偏差は 0.012 でした。100 ppb、200 ppb、400 ppb における平均 RSD は、それぞれ 13 %、7 %、および 6 % でした。10 以上の S/N 比で判定される定量可能なレベルは、高濃度の植物マトリックスで 1~100 ppb の範囲であることがわかりました。

図 5 に、非常に活性の高い 2 つの合成カンナビノイド、JWH-018 および JWH-073 の 100～400 ng/mL における検量線を示します。100 ng/mL における JWH-018 の典型的なクロマトグラムを図 6 に示します。

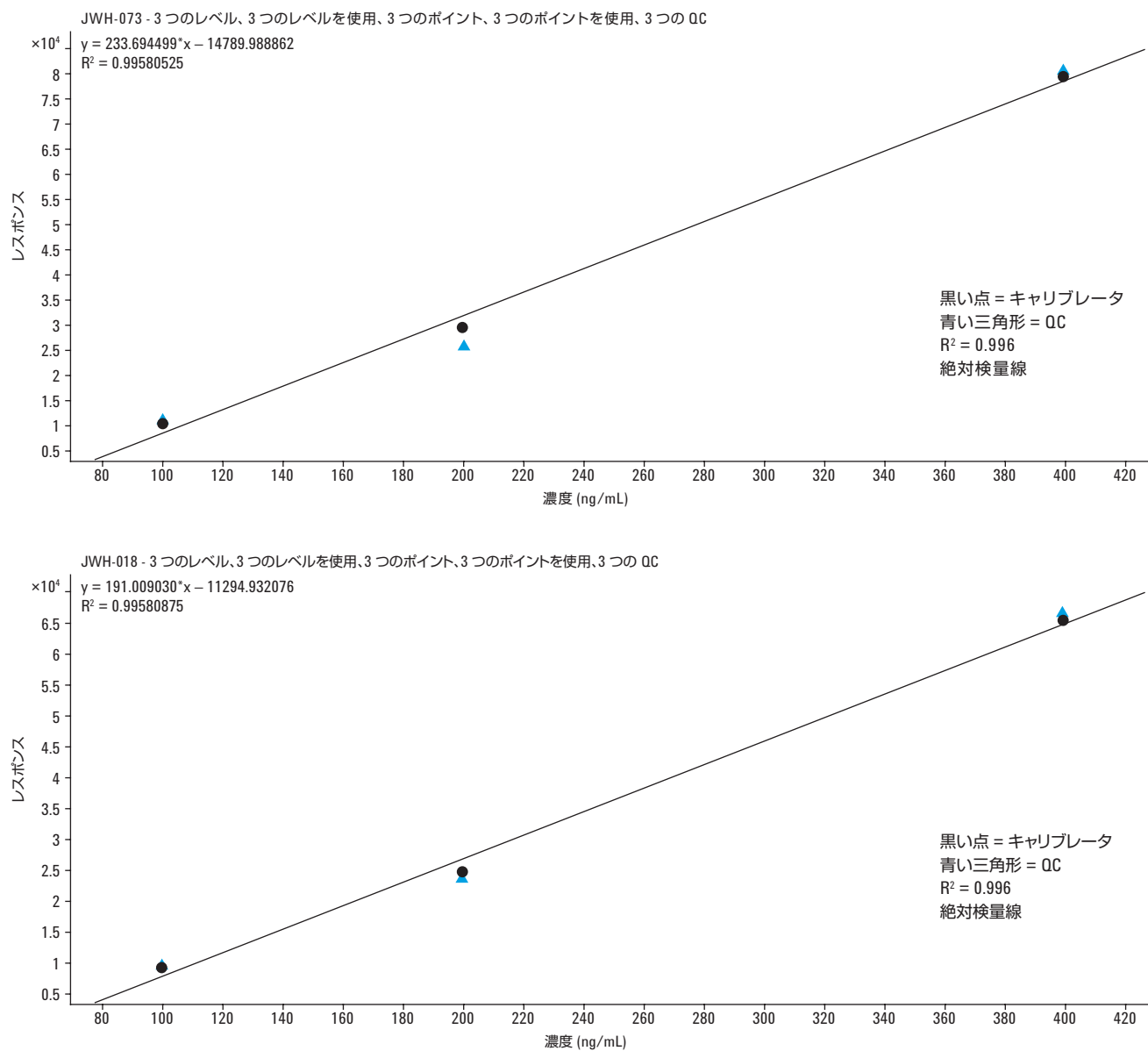


図 5. JWH-018 と JWH-073 の検量線 優れた直線性を示しています

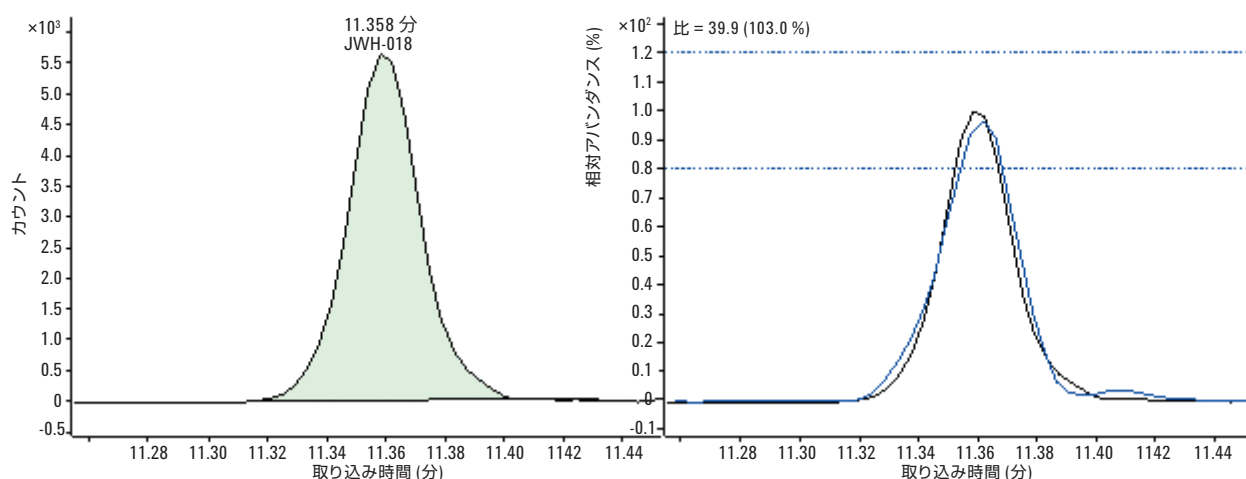


図 6. JWH-018 の 100 ng/mL 添加における分析結果。影を付けたピークはターゲットイオンのトランジションを示します (m/z 324→254)。
右側はクオリファイアイオンのトランジション (m/z 341→167) が、このメソッドについて確立された基準 (水平線) 以内であることを示します

幅広いハーバルブレンドを測定した結果、JWH-073 および JWH-018 は、50~150 ppb の濃度範囲ですべてのブレンドについて検出されました。特に、面積値に基づいて求めたところ、K2 Blondie には JWH-073 および JWH-018 が 1000 倍の濃度で含まれていることが推定されました。すべてのブレンドに複数の合成カンナビノイドが含まれていたことが、予想されるリテンションタイムにおけるターゲットイオンの検出とクオリファイアイオンの正しい比率によって確認されました。

結論

ハーバルブレンドに含まれる合成カンナビノイドの分析には、トリプル四重極 MS が有効です。マトリックス効果を打ち消し、S/N 比を向上するその機能により、分析結果の信頼性が大きく向上します。シングル四重極 MS と異なり、トリプル四重極 MS は、マススペクトルデコンボリューションやレビューなどのデータ取り込み後の処理を追加することなく誤判定を軽減し、優れた検出下限を実現するため、大幅な時間の短縮がもたらされます。

参考文献

1. Chemicals Used in “Spice” and “K2” Type Products Now Under Federal Control and Regulation. News Release. Public Affairs, U.S. Drug Enforcement Administration. March 1, 2010. <http://www.justice.gov/dea/pubs/pressrel/pr030111.html>
2. Notice of Intent to Temporarily Control Five Synthetic Cannabinoids. Office of Diversion Control, U.S. Department of Justice, Drug Enforcement Administration, Federal Register Notices, Rules – 2011. http://www.deadiversion.usdoj.gov/fed_regs/rules/2011/fr0301.htm
3. T.J. Gluodenis Jr., Identification of Synthetic Cannabinoids in Herbal Incense Blends. Forensic Magazine. 31-35. June/July 2011.
4. Agilent Technologies, Inc. Identification of Synthetic Cannabinoids in Herbal Incense Blends by GC/MS, Application Compendium. P/N 5990-7967EN. April 2011.

謝辞

この実験で使用したハーバルブレンド抽出物を提供していただいた、National Medical Services (NMS) Laboratory (ペンシルベニア州ウィローグローブ) に感謝の意を表します。また、サンプル前処理および抽出メソッドの開発について NMS の Fran Diamond 氏にも感謝の意を表します。

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
Printed in Japan
September 14, 2011
5990-8987JAJP



Agilent Technologies